

利用甲硝唑及外加氧方法筛选耐氧产氢 *Klebsiella oxytoca* HP1 突变菌株

邬小兵¹ 徐惠娟¹ 支小鹏¹ 徐方成² 胡忠¹ 龙敏南^{1*}

(1. 厦门大学生命科学学院 厦门 361005)

(2. 厦门大学化学化工学院 厦门 361005)

摘要: 氢酶是生物制氢的关键酶, 大多数氢酶因对氧极敏感而易失活, 因此提高氢酶的氧耐受性对生物制氢有重要意义。本研究利用 1% 甲基磺酸乙酯对 *Klebsiella oxytoca* HP1 进行了两轮诱变, 经 40 mmol/L 甲硝唑和 21% 氧联合处理 1 h (第一轮诱变) 或 2 h (第二轮诱变) 进行筛选。所得突变菌株经产氢测试, 结果在 15% 氧浓度条件下, 第一代突变菌株 HP1-A15 产氢活性为出发菌株 *Klebsiella oxytoca* HP1 的 3.70 倍, 在 21% 氧浓度条件下第二代突变菌株 HPA15-37 产氢活性为 HP1-A15 菌株的 2.75 倍, 是出发菌株的 11 倍。突变菌株 HP1-A15 和 HPA15-37 具有较好的遗传稳定性。本试验结果说明利用 MNZ 和外加氧的方法适用于兼性厌氧菌耐氧产氢突变菌株的筛选。
关键词: 氢酶, 耐氧, 甲硝唑, 突变, *Klebsiella oxytoca* HP1

Screen of O₂-tolerate Phenotype of *Klebsiella oxytoca* HP1 Mutants with High H₂-evolving Activity by Selection with MNZ Combination O₂

WU Xiao-Bing¹ XU Hui-Juan¹ ZHI Xiao-Peng¹ XU Fang-Cheng² HU Zhong¹
LONG Min-Nan^{1*}

(1. School of Life Science, Xiamen University, Xiamen 361005)

(2. School of Chemistry and Chemical Engineering, Xiamen University, Xiamen 361005)

Abstract: Hydrogenases are key enzyme for bio-hydrogen production, most of them were rapidly inactivated by oxygen. It is important to bio-hydrogen production and hydrogen application that improve the O₂-tolerance of hydrogenase. In this experiment, the hydrogen producing strain *Klebsiella oxytoca* HP1 was treated with 1% ethyl methanesulfonate (EMS), the mutants with high O₂-toleration ability were screened with 40 mmol/L metronidazole (MNZ) and 21% oxygen. The H₂-evolving activity of the first generation mutant HP1-A15 was increased 3.70 times than that of the wild-type (WT) under 15% oxygen. The H₂-evolving activity of the second generation mutant HPA15-37 was enhanced 11 times than that of WT under the condition of 21% oxygen. The mutants HP1-A15 and HPA15-37 had steady heredity. These results suggest that MNZ and in addition oxygen is a good way to screen of O₂-tolerate phenotype of facultative anaerobe with

基金项目: 福建省青年科技人才创新项目 (No. 12005J003); 厦门市科技项目 (No. 13502Z20041070)

* 通讯作者: Tel: 0592-2185731; 信箱: longmn@xmu.edu.cn

收稿日期: 2007-08-02; 接受日期: 2007-09-30

high H₂-evolving activity.

Keywords: Hydrogenase, O₂-tolerant, Metronidazole, *Klebsiella oxytoca* HP1, Mutagenesis

氢酶存在于许多微生物细胞中,具有催化产氢和吸氢的功能。在微生物细胞内,氢酶可以催化发酵产氢和光解水产氢。在细胞外,氢酶制成的电极具有催化H₂和电能相互转化的特性,可应用于电解水产氢和燃料电池的研究^[1,2]。在生物燃料电池中,氢酶氧化氢产生电流,Karyakin等^[1]证明氢酶电极和市售燃料电池中所使用的金属(铂或铂族金属)电极在能量转化效率上是相同的。而氢酶具有廉价、可再生、耐受一氧化碳毒性等优点。可见,氢酶对氢的制取和应用都非常重要,是氢能源开发的关键酶类。然而氢酶对分子氧极为敏感的特性阻碍了氢酶的应用^[3,4,5],普通氢酶在1%的氧压下即迅速失活,而光解水产氢和电解水产氢的过程都伴随着氧的释放,H₂-O₂燃料电池也需要氧作为氧化剂。因此,提高氢酶的氧耐受性对氢能源的开发和应用有重要意义。

获得耐氧氢酶有3种途径:(1)直接从环境中筛选分离^[6]。(2)对高效氢酶基因进行定点突变^[7,8]。此研究的难点在于,要进行准确的定点突变,需要了解氢酶耐氧的结构基础,而这方面的研究报道较少。(3)诱变选育。这需要找到一种快速高效的筛选方法。Flynn^[9]通过随机化学诱变,利用甲硝唑和绿藻光照条件下的内生氧筛选绿藻突变株,获得了氧耐受力提高10倍的产氢突变株。*Klebsiella oxytoca* HP1是本实验室分离得到的一株产氢细菌,属于兼性厌氧菌^[10,11]。为提高该菌株耐氧产氢活性,我们设计了一种适用于兼性厌氧微生物耐氧产氢突变菌株的筛选方法——利用MNZ和外加氧联合作用的方法。

1 材料和方法

1.1 菌种和试剂

K. oxytoca HP1,本实验室筛选并保藏^[10]。甲基磺酸乙酯(Ethyl methanesulfonate, EMS)购自Alfa aecar公司,甲硝唑(Metronidazole, MNZ)购自Fluka公司,其余试剂均为国产分析纯。

1.2 培养基

生长培养基:葡萄糖 10g,蛋白胨 10g,酵母膏 2g, NaCl 5g, FeSO₄·7H₂O 0.3g, MgSO₄·7H₂O 0.3g,

加水定容至1L, pH 7.0, 1 × 10⁵ Pa 灭菌 20 min。固态培养基中加入1.6%的琼脂。

产氢培养基:葡萄糖 10g, Na₂HPO₄·7H₂O 14.33g, KH₂PO₄ 3.63g, 加水定容至1L, pH 7.0, 1 × 10⁵ Pa 灭菌 20 min。

1.3 EMS 诱变

1.3.1 菌悬液的制备:将*K. oxytoca* HP1接种于含20 mL生长培养基的100 mL三角瓶中,置于摇床培养(130 r/min, 37 ℃)过夜。离心(4000 r/min, 20 min)收集菌体,菌体重悬于磷酸缓冲液(pH 7.0),调节菌体浓度为OD₆₀₀=1。

1.3.2 EMS对*K. oxytoca* HP1菌致死曲线:分别取*K. oxytoca* HP1细胞悬液100 μL(细胞数1 × 10⁸)置于6支相同的5 mL离心管,离心收集菌体,将5支离心管中的细胞悬浮于0.5 mL EMS溶液(1%,用pH7.0的磷酸钾缓冲液配制),于37 ℃分别振荡培养5 min, 10 min, 15 min, 20 min, 40 min。另一支试管中的细胞悬浮于pH7.0的磷酸钾缓冲液中作为对照。处理完毕的细胞悬液用10倍体积的的硫代硫酸钠溶液(0.16 mol/L)终止反应,离心收集菌体,1 mL无菌生理盐水洗涤1次,悬浮细胞于1 mL LB培养液,按稀释涂布平板法涂布10⁻¹~10⁻⁶平板各3个。将平板置于37 ℃培养至菌落出现。各样品菌落数为其3个平板菌落平均数,样品成活率和致死率按以下公式计算:样品成活率(%)=(M_p/M_c) × 100%, 样品致死率(%)=(1-M_p/M_c) × 100%, 其中, M_p为样品菌落平均数, M_c为空白对照菌落平均数。

1.3.3 诱变:取*K. oxytoca* HP1菌悬液1 mL,离心(3000 r/min, 20min)收集菌体,将细胞悬浮于5 mL EMS溶液,置于37 ℃进行诱变(诱变时间由1.3.2确定),用硫代硫酸钠溶液终止反应。离心收集菌体,菌体用LB培养液洗1次。在各离心管中加LB培养液2 mL,充氩气,37 ℃振荡培养2 h,以诱导氢酶的表达。

1.4 甲硝唑和外加氧对*K. oxytoca* HP1突变菌株的筛选

1.4.1 筛选条件的确定:将*K. oxytoca* HP1接种于装有20 mL生长培养基的100 mL三角瓶中,置于摇床过夜培养。离心收集菌体,菌体重悬于产氢培养基,

调节菌体浓度为 $OD_{600}=1$ 。7 支小瓶(带橡皮塞, 25 mL)中各加入 2 mL 菌悬液, 瓶内充氩气, 置于 37 温育 2 h 恢复氢酶活性。7 个样品分别做如下处理:(1) 用注射器向 3 个反应体系中注入 MNZ 至终浓度为 40 mmol/L, 瓶内充入空气, 分别于 37 振荡培养 0.5 h, 1 h 和 2 h。(2) 另外 3 个反应体系中注入 MNZ 至 40 mmol/L, 分别于 37 振荡培养 0.5 h, 1 h 和 2 h。(3) 空白对照, 不做处理。每个样品设置 3 个重复。将处理完毕的菌悬液转移至 5 mL 离心管, 离心收集菌体, 用磷酸缓冲液洗 1 次, 重悬菌体于 2 mL 磷酸缓冲液, 按稀释涂布平板法涂布 10^{-1} ~ 10^{-6} 平板各 3 个, 将平板置于 37 培养至菌落出现, 计数各试验菌落平均数。各样品菌落数按照如下公式计算: $M_S = (M_{S1} + M_{S2} + M_{S3}) / 3$, 其中, M_S 为测试样品菌落平均数(cfu/mL), M_{S1} , M_{S2} 和 M_{S3} 分别为各试验组 3 个重复的菌落数(cfu/mL)。

1.4.2 耐氧突变菌株的筛选: 诱变后的细菌经离心收集菌体, 重悬于 2 mL 产氢培养基, 按 1.4.1 所描述的方法和确定的条件筛选耐氧突变株, 当平板长出菌落后, 用灭菌牙签挑取突变菌株于生长培养基平板上培养。

1.5 突变株的耐氧产氢测试

培养测试菌株并离心收集菌体, 生理盐水洗涤后重悬于产氢培养基, 调节 $OD_{600}=1$ 。0.2 mL 菌悬液装入 25 mL 血清瓶, 瓶内充氩气, 然后注入氧气至氧浓度为 15% (第一代突变菌株) 或 21% (第二代突变菌株)。每个试验组设置 3 个重复。各试验组置于摇床进行产氢培养 5 h (37 , 130 r/min), 于 102 G 气相层析仪测定产氢量, 用记录仪记录产氢数据。各试验组 3 个重复的平均产氢活性计为该试验菌株的耐氧产氢活性。

1.6 菌体干重分析

将细菌培养液 200 mL 离心(7000 r/min, 10 min), 收集菌体, 重悬细胞于无菌水中, 再离心收集菌体, 在 105 下干燥至恒重。经分析, $OD_{600} = 1$ 对应于 0.6 g/L 干重(dw)。

1.7 突变菌株的遗传稳定性测试

将突变菌株 HP1-A15 及 HPA15-37 接种到平板培养基上作为第一代, 取平板接种于装有生长培养基的血清瓶中置于摇床培养(37 , 130 r/min), 每 24 h 传代 1 次, 连续传种 5 代。并测定各代突变菌株耐氧产氢活性。

2 实验结果

2.1 EMS 对 *K.oxytoca* HP1 的诱变致死曲线

EMS 是一种烷化剂, 它可以诱导 A-T 碱基向 G-C 转换的突变, 某些突变对细胞是致死的, 目前对某一种诱变剂的突变率和致死率之间的理论关系还无法预测, 但在一定的基因组中的突变率会随着突变致死率的降低而下降。过去常采用杀菌率较高的诱变剂量, 根据对紫外线、X 射线和 EMS 等诱变效应的研究结果, 发现正变较多地出现在偏低的剂量中, 而负变则较多地出现于偏高的剂量中。目前诱变育种工作中比较倾向于采用较低的致死剂量 (30%~75%), 用 EMS 作诱变剂时, 较多地采用半致死或更低的致死剂量^[9], 因此本实验选择 40% 致死 (60% 存活率) 剂量。图 1 为 1% EMS 作用对野生型菌株 *K. oxytoca* HP1 和第一代突变菌株 HP1-A15 的致死曲线, 结果表明 1% 的 EMS 对野生型菌株作用 15 min, 突变后存活率为 60%, 同样浓度的 EMS 对第一代突变株致死作用降低, 因此我们对野生菌株的诱变处理时间选择为 15 min, 第一代突变株处理时间选择为 20 min。

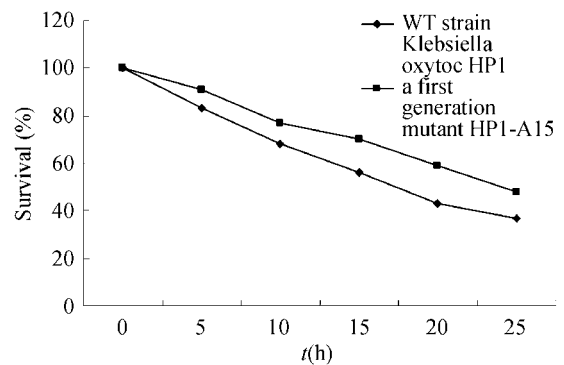


图 1 EMS 诱变处理对 *Klebsiella oxytoca* HP1 及 HP1-A15 细胞的致死曲线

Fig. 1 Killing curves of *Klebsiella oxytoca* HP1 and HP1-A15 treated with EMS

2.2 MNZ 和外加氧对 *K. oxytoca* HP1 的致死选择作用

长期以来 MNZ 被用于治疗原虫和厌氧菌感染等疾病。MNZ 对厌氧菌杀灭作用的原理在于厌氧菌的硝基还原酶能将 MNZ 的硝基还原成一种细胞毒, 可作用于细菌 DNA 代谢过程。MNZ 对需氧菌和兼性厌氧菌无直接作用, 但 MNZ 在细胞内能被电子还原成还原态, 在有氧条件下, 还原态的 MNZ 能和

氧反应产生超氧根阴离子和过氧化氢,从而杀死细菌。*K. oxytoca* HP1 是一种兼性厌氧菌,其细胞中的氢酶可以和 MNZ 竞争由 Fd 传来的电子,如果氢酶有活性,部分来源于 Fd 的电子可用于产氢,从而减轻对细胞的毒性。Flynn^[9]曾利用 40 mmol/L MNZ 和绿藻光照条件下的内生氧筛选耐氧产氢突变藻株。表 1 为 MNZ 和外加氧处理对 *K. oxytoca* HP1 细胞的致死作用。在 37 °C 条件下产氢培养基中加入 40 mmol/L 的 MNZ 和气相中 21% 的外加氧对 *K. oxytoca* HP1 作用 0.5 h 后仍有 0.12% 细胞存活,作用 1h 后细胞被完全杀死,而在其他条件相同的情况下仅用 MNZ 不加氧作用 1h,细胞的存活率为 51.3%,用相同条件对第一代突变菌株 HP1-A15 作用 2 h 后

细胞存活率为零。此结果说明在产氢培养基中, MNZ 和外加氧对 *K. oxytoca* HP1 具有致死作用, 40 mmol/L 的 MNZ 及 21% 氧联合作用可以作为耐氧产氢突变株的筛选模型, 筛选第一代突变株的处理时间为 1 h, 筛选第二代突变株的处理时间为 2 h。

2.3 突变株的耐氧产氢试验

K. oxytoca HP1 菌株经诱变、筛选后进行耐氧产氢测试, 得到 10 株耐氧产氢活性较高的第一代突变菌株(结果见表 2), 其中 HP1-A15 的耐氧产氢活性为 *K. oxytoca* HP1 菌株的 3.70 倍。

HP1-A15 突变株再经 EMS 诱变、筛选后进行耐氧产氢测试, 得到 10 株耐氧产氢活性较高的第二代突变菌株(见表 3), 其中 HPA15-37 产氢活性为

表 1 MNZ 和外加氧处理对 *K. oxytoca* HP1 及第一代突变株 HP1-A15 存活的影响
Table 1 Survival rate of *K. oxytoca* HP1 and HP1-A15 treated with MNZ and O₂

		Time(h)	0.5	1	1.5	2
<i>K. oxytoca</i> HP1	Survival(MNZ)		81.3%	51.3%	40.7%	36.2%
	Survival(MNZ+O ₂)		0.12%	0	0	0
HP1-A15	Survival(MNZ)		84.5%	53.1%	38.8%	34.4%
	Survival(MNZ+O ₂)		51.21%	24.63%	0.24%	0

表 2 第一代突变菌株的耐氧产氢活性

Table 2 Hydrogen evolving activity of first generation mutants in oxygen atmosphere

Strain	Hydrogen evolving activity (mmol/g dw· h),	
	0% oxygen in gas phase	15% oxygen in gas phase
<i>K. oxytoca</i> HP1	8.3	0.6
HP1-A1	8.1	1.6
HP1-A7	7.9	1.3
HP1-A12	7.8	1.8
HP1-A15	8.5	2.2
HP1-A37	8.3	1.4
HP1-A39	8.1	2.1
HP1-A50	8.4	1.7
HP1-A72	7.5	1.3
HP1-A78	7.7	2.0
HP1-A83	8.2	1.7

表 3 第二代突变菌株在气相中含有 0% 或 21% 氧时的产氢活性

Table 3 Hydrogen evolving activity of second generation mutants in oxygen atmosphere

Strain	Hydrogen evolving activity (mmol/g dw· h),	
	0% oxygen in gas phase	21% oxygen in gas phase
<i>K. oxytoca</i> HP1	8.3	0.1
HP1-A15	8.4	0.4
HPA15-8	8.8	0.7
HPA15-23	7.4	0.9
HPA15-27	7.7	0.9
HPA15-37	8.2	1.1
HPA15-54	7.5	0.8
HPA15-61	8.1	1.0
HPA15-65	8.0	1.0
HPA15-82	7.7	0.7
HPA15-91	7.9	0.8
HPA15-93	8.4	0.6

HP1-A15 菌株的 2.75 倍, 是出发菌株 *K. oxytoca* HP1 的 11 倍。

2.4 突变菌株的遗传稳定性

将突变菌株在生长培养基上连续传代 5 代, 结果 HP1-A15 和 HPA15-37 各代与亲代的耐氧产氢活性的变化都在 10% 以内(见表 4 和表 5), 没有明显变化, 说明突变菌株 HP1-A15 和 HPA15-37 具有较好的遗传稳定性。

表 4 突变菌株 HP1-A15 的遗传稳定性
Table 4 Hereditary stability of mutant HP1-A15

Generations	Hydrogen evolving activity (mmol/g dw·h), 15% oxygen in gas phase	Hereditary stability (%)
0	2.23	—
1	2.11	94.6
2	2.05	97.2
3	1.93	94.1
4	2.02	95.3
5	2.04	99.0

表 5 突变菌株 HPA15-37 的遗传稳定性
Table 5 Hereditary stability of mutant HPA15-37

Generations	Hydrogen evolving activity (mmol/g dw·h), 21% oxygen in gas phase	Hereditary stability (%)
0	1.12	—
1	1.03	92.0
2	1.07	96.1
3	0.97	90.6
4	1.05	93.8
5	1.02	97.1

3 讨论

氢酶是生物制氢的关键酶类, 提高氢酶的氧耐受性可以提高生物制氢的效率, 因而对氢能的开发和应用有重要意义。利用诱变的方法提高氢酶的氧耐受性, 需要找到一个有效的筛选方法。Flynn 利用 MNZ 和绿藻光照条件下的内生氧对绿藻突变株进行筛选, 获得了氧耐受力提高 10 倍的产氢突变株。本实验用 40mmol/L 的 MNZ 和气相中 21% 的氧作用来筛选 *K. oxytoca* HP1 耐氧产氢突变株, 结果第一代突变菌株 HP1-A15 的耐氧产氢活性为出发菌株 *K. oxytoca* HP1 的 3.70 倍; 第二代突变菌株 HPA15-37 的耐氧产氢活性为 HP1-A15 菌株的 2.75 倍, 是出发菌株的 11 倍。本实验结果说明利用 MNZ 和外加氧的方法适用于兼性厌氧菌耐氧产氢突变菌株的筛选。

突变菌株耐氧产氢活性的提高可能有如下原因: (1) 突变使氢酶结构发生变化从而使其耐氧活性提高; (2) 突变菌株比野生型菌株耗氧速度提高。因此此方法筛选到的耐氧产氢突变菌株并不能特异性得到高耐氧活性的氢酶, 要得到高活性的耐氧氢酶, 还需要对耐氧产氢突变株的氢酶作进一步的耐氧测试。

参考文献

- [1] Karyakin AA, Morozov SV, Karyakina EE, *et al.* Hydrogen fuel electrode based on bioelectrocatalysis by the enzyme hydrogenase. *Electrochemistry Communications*, 2002, **4**: 417–420.
- [2] Morozova SV, Vignaisb PM, Cournacc L, *et al.* Bioelectrocatalytic hydrogen production by hydrogenase electrodes. *International Journal of Hydrogen Energy*, 2002, **27**: 1501–1505.
- [3] Morozov SV, Voronin OG, Karyakina EE. Tolerance to oxygen of hydrogen enzyme electrodes. *Electrochemistry Communication*, 2006, **8**: 851–854.
- [4] Wenk SO, Qiana DJ, Wakayama T. Biomolecular device for photoinduced hydrogen production. *International Journal of Hydrogen Energy*, 2002, **27**: 1489–1493.
- [5] Vincent A, Marc F. Some general principles for designing electrocatalysts with hydrogenase activity. *Coordination Chemistry Reviews*, 2005, **249**: 1518–1535.
- [6] Hirofumi N, Youji M, Katsuhiko A, *et al.* Characterization of an extremely thermophilic and oxygen-stable membrane-bound hydrogenase from a marine hydrogen-oxidizing bacterium *hydrogenovibrio marinus*. *Biochemical And Biophysical Research Communications*, 1997, **232**: 766–770.
- [7] Liu JJ, Long MN. Recent advances on the structure and catalytic mechanism of hydrogenase. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2005, **21**(3): 348–353.
- [8] Rousset M, Montet Y, Guigliarelli B, *et al.* [3Fe-4S] to [4Fe-4S] cluster conversion in *Desulfovibrio f ructosovorans* [NiFe] hydrogenase by site-directed mutagenesis. *PNAS*, 1998, **95**(20): 11625–11630.
- [9] T Flynn, M Lucia Ghirardi, M. Seibert. Accumulation of O₂-tolerant phenotypes in H₂-producing strains of *Chlamydomonas reinhardtii* by sequential applications of chemical mutagenesis and selection. *International Journal of Hydrogen Energy*, 2002, **27**: 1421–1430.
- [10] Long MN, Hang JI, Wu XB, *et al.* Isolation and characterization of a high H₂-producing strain *Klebsiella oxytoca* HP1 from a hot spring. *Research in Microbiology*, 2005, **156**: 76–81.
- [11] 朱俊波, 龙敏南, 徐方成, 等. *Klebsiella oxytoca* HP1 *adhE* 基因插入失活法构建产氢重组菌. *科学通报*, 2007, **52**(1): 55–58.